

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平8-131197

(43) 公開日 平成8年(1996)5月28日

(51) Int.Cl. ⁸	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 Q	1/60	6807-4B		
	1/26	6807-4B		
	1/32	6807-4B		
	1/44	6807-4B		

審査請求 有 請求項の数 3 O L (全 8 頁)

(21) 出願番号	特願平6-296137	(71) 出願人	000162478 協和メデックス株式会社 東京都中央区入船二丁目1番1号
(22) 出願日	平成6年(1994)11月30日	(72) 発明者	宮内 一人 静岡県田方郡函南町仁田816-4
(31) 優先権主張番号	特願平6-37328	(72) 発明者	三池 彰 静岡県駿東郡長泉町納米里410-1
(32) 優先日	平6(1994)3月8日	(72) 発明者	首藤 栄子 大分県大分市花園17組の3
(33) 優先権主張国	日本 (J P)	(72) 発明者	杉内 博幸 熊本県熊本市長嶺町1675-31
(31) 優先権主張番号	特願平6-217224	(72) 発明者	入江 徹美 熊本県熊本市健軍町2484-17
(32) 優先日	平6(1994)9月12日		
(33) 優先権主張国	日本 (J P)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 高密度リポ蛋白中のコレステロールの定量法

(57) 【要約】

【目的】 煩雑な分画分離操作の不要な簡便な高密度リポ蛋白 (HDL) 中のコレステロールの定量法を提供する。

【構成】 HDL以外のリポ蛋白を凝集させる試薬の存在下、HDLを含有する試料にコレステロールエステル加水分解酵素およびコレステロール酸化酵素またはコレステロール脱水素酵素を作用させ、生成する過酸化水素または還元型補酵素を定量することを特徴とするHDL

【特許請求の範囲】

【請求項1】 高密度リポ蛋白（HDL）以外のリポ蛋白を凝集させる試薬の存在下、HDLを含有する試料にコレステロールエステル加水分解酵素およびコレステロール酸化酵素またはコレステロール脱水素酵素を作用させ、生成する過酸化水素または還元型補酵素を定量することを特徴とするHDL中のコレステロールの定量法。

【請求項2】 HDL以外のリポ蛋白を凝集させる試薬がヘパリンまたはその塩、リンタングステン酸またはその塩、デキストラン硫酸またはその塩、ポリエチレングリコール、硫酸化シクロデキストリンまたはその塩、硫酸化オリゴ糖またはその塩もしくはこれらの混合物、および2価の金属塩からなる請求項1記載のHDL中のコレステロールの定量法。

【請求項3】 コレステロールエステル加水分解酵素、コレステロール酸化酵素またはコレステロール脱水素酵素が化学修飾されたコレステロールエステラーゼ、化学修飾されたコレステロールオキシダーゼまたは化学修飾されたコレステロールデヒドロゲナーゼである請求項1記載のHDL中のコレステロールの定量法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、臨床診断の分野において脂質代謝の面で重要な高密度リポ蛋白（HDL）中のコレステロール（以下、HDLコレステロールという）の定量法に関する。

【0002】

【従来の技術】HDLは、動脈壁を含めた各組織からコレステロールを受け取るため細胞内に蓄積したコレステロールの除去作用に関係し、冠動脈硬化症をはじめとする各種動脈硬化症の危険予防因子であり、その血中レベルは動脈硬化性疾患の発症予知に有用な指針となることが知られている。従来のHDLコレステロールの定量法は、大きく分けて分画操作とコレステロール定量操作の2段階からなる。分画操作法には、超遠心法、免疫化学的方法、電気泳動法、沈殿法などがある。超遠心法を用いる場合には、分離用超遠心器で比重の差によってHDLを分離し、そのコレステロール量を測定する。しかしながら、定量性、簡便性、経済性などの面で欠点がある。免疫化学的方法には、免疫電気泳動法、一元免疫拡散法（SRID法）、オクタロニー法などがあるが、これらの方法を用いる場合にはアポ蛋白を認識しており、正確にはリポ蛋白を認識していないという問題がある。電気泳動法を用いる場合には、セルロースアセテート膜やアガロースゲルなどを支持体として分離し、酵素法によりコレステロールを定量する。この方法は、簡便性、経済性などの面で問題がある。沈殿法を用いる場合には、低密度リポ蛋白（LDL）、超低密度リポ蛋白（VLDL）およびカイロミクロン（CM）の表面に存在するアポ蛋白Bにポリエチレングリコール、ヘパリン、リ

ンタングステン酸、デキストラン硫酸などのポリアニオンと2価の陽イオンを結合させ、不溶性沈殿物を形成させ、これを遠心分離操作によって除去し、上清中のHDLコレステロールを定量する（臨床検査法提要、第29版、金井泉著、金原出版、471頁、1983年）。この方法は最も簡便であるが、遠心分離器による遠心分離操作を行うため、多数検体処理、迅速測定および臨床検査の分野で多く使用されている自動分析装置には不向きである。さらに、従来の分画法では、分離したHDL画分を定量ビペットではかり取る場合などに人為的誤差も生じ易い。以上のように、HDLコレステロール測定の煩雑さは、その分画操作にある。しかしながら、単純にHDLを分画せずに血清検体を直接コレステロールエステラーゼとコレステロールオキシダーゼが含有された試薬に添加しても、総コレステロールを定量する系と変わりがなく、HDLコレステロールを特異的に定量できない。特開昭63-126498には、コール酸類を添加してその特異性を高めることが記載されているが、この方法では、HDLのみならずLDL、VLDLなども徐々に反応し完全な反応終点が得られにくいことにより、特異性が必ずしも充分でない。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】本発明の目的は、煩雑な分画分離操作の不要な簡便なHDLコレステロールの定量法を提供することにある。

【0004】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、HDL以外のリポ蛋白すなわちLDL、VLDLおよびCMを凝集させる試薬の存在下、コレステロール反応試薬を用いてコレステロール定量の酵素反応をさせることにより、特に生成した凝集物を分離することなくHDLを含有する試料中のHDLコレステロールを特異的に定量できることを見出し、本発明に至った。

【0005】本発明は、HDL以外のリポ蛋白を凝集させる試薬の存在下、HDLを含有する試料にコレステロール加水分解酵素およびコレステロール酸化酵素またはコレステロール脱水素酵素を作用させ、生成する過酸化水素または還元型補酵素を定量することを特徴とするHDL中のコレステロールの定量法に関する。

【0006】本発明方法は、血液、尿などのHDLを含有する体液に適用できる。次に、本発明の定量法の一例について説明する。第一試薬として、HDL以外のリポ蛋白を凝集させる試薬を含む中性付近の緩衝液を調製する。また、第二試薬として、コレステロールエステラーゼ、コレステロールオキシダーゼ（またはコレステロールデヒドロゲナーゼ）、パーオキシダーゼ、4-アミノアンチピリンおよびトリンダー試薬〔またはNAD（P）〕を含む緩衝液を調製する（トリンダー試薬は第一試薬中に入れてもよい）。体液検体を一定量第一試薬に添加し、例えば37℃で数分間加温してLDL、VL

DLおよびCMを凝集させる。これに第二試薬を添加、攪拌して酵素反応させた後、コレステロールオキシダーゼにより過酸化水素が発生する場合には4-アミノアンチピリンおよびトリンダー試薬から過酸化水素とパーオキシダーゼによって生成する色素の極大波長における吸光度を測定し、コレステロールデヒドロゲナーゼを用いる場合にはNAD(P)Hの増加を300~500nm、好ましくは330~400nm、例えば340nmでの吸光度で測定する(ジアホラーゼ、テトラゾリウム塩を添加してホルマゼン色素の発色に導き、ホルマゼン色素を比色定量することも可能である)。HDLコレステロール量は、別途一定量のコレステロールを含む標準液で同じ操作を行い、比較計算する。なお、第一試薬と第二試薬とを最初からまとめ、これに体液検体を添加して例えば37℃で数分間加温し、LDL、VLDLおよびCMを凝集させてさらに酵素反応させることもできる。

【0007】リポ蛋白を凝集させる試薬には凝集剤および2価の金属塩が含まれる。凝集剤としては、ヘパリンまたはその塩、リンタングステン酸またはその塩、デキストラン硫酸またはその塩、ポリエチレングリコール、硫酸化シクロデキストリンまたはその塩、硫酸化オリゴ糖またはその塩、もしくはこれらの混合物などがあげられ、シクロデキストリンとしては、 α -シクロデキストリン、 β -シクロデキストリン、 γ -シクロデキストリンなどがあげられ、オリゴ糖としては、マルトトリオース、マルトテトラオース、マルトペンタオース、マルトヘキサオース、マルトヘプタオースなどがあげられ、塩としては、ナトリウム塩、カリウム塩、リチウム塩、アンモニウム塩、マグネシウム塩などがあげられる。2価

の金属塩としては、マグネシウム塩、カルシウム塩、マンガン塩、ニッケル塩などがあげられる。
【0008】凝集剤としては、0.02~10mMの分子量5000~20000のヘパリンまたはその塩、0.1~10mMの分子量4000~8000のリンタングステン酸またはその塩、0.01~5mMの分子量10000~500000のデキストラン硫酸またはその塩、0.1~20mMの分子量1000~10000のデキストラン硫酸またはその塩、0.3~100mMの分子量4000~25000のポリエチレングリコール(PEG)、0.1~50mMの分子量1000~3000の硫酸化シクロデキストリンまたはその塩、0.1~50mMの分子量400~3000の硫酸化オリゴ糖またはその塩、もしくはこれらの混合物などが好ましく用いられる。さらに好ましくは、0.03~1mMの分子量14000~16000のヘパリンまたはその塩、0.1~3mMの分子量5000~7000のリンタングステン酸またはその塩、0.01~5mMの分子量150000~250000のデキストラン硫酸またはその塩、0.1~10mMの分子量1000~500

0のデキストラン硫酸またはその塩、1.0~50mMの分子量5000~22000のPEG、0.1~10mMの分子量1000~2000の硫酸化シクロデキストリンまたはその塩、0.1~10mMの分子量400~2000の硫酸化オリゴ糖またはその塩、もしくはこれらの混合物などが用いられる。

【0009】2価の金属塩としては、0.1~50mMのマグネシウム塩、カルシウム塩、マンガン塩、ニッケル塩などがあげられ、好ましくは、0.1~50mMのマグネシウム塩が用いられる。

【0010】トリンダー試薬としては、N-エチル-N-(3-メチルフェニル)-N'-サクシニルエチレンジアミン(EMSE)、N-エチル-N-(3-メチルフェニル)-N'-アセチルエチレンジアミン、N,N-ジメチル-m-トルイジン、N,N-ジスルホプロビル-3,5-ジメトキシアニリン、N-エチル-N-スルホプロビル-m-アニシジン、N-エチル-N-スルホプロビルアニリン、N-エチル-N-スルホプロビル-3,5-ジメトキシアニリン、N-スルホプロビル-3,5-ジメトキシアニリン、N-エチル-N-スルホプロビル-3,5-ジメチルアニリン、N-エチル-N-スルホプロビル-m-トルイジン、N-エチル-N-スルホプロビル-3,5-ジメトキシ-3-スルホプロビル)-m-アニシジン、N-エチル-N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロビル)アニリン、N-エチル-N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロビル)-3,5-ジメトキシアニリン、N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロビル)-3,5-ジメトキシアニリン、N-エチル-N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロビル)-3,5-ジメチルアニリン、N-エチル-N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロビル)-m-トルイジン、N-スルホプロビルアニリン、3-ヒドロキシ-2,4,6-トリヨード安息香酸、フェノールなどがあげられる。

【0011】酵素としては、通常市販されている、コレステロールエステルを加水分解する能力を有する微生物または動物由来のコレステロールエステラーゼやリポ蛋白リパーゼ、コレステロールを酸化して過酸化水素を生成する微生物由来のコレステロールオキシダーゼ、微生物または動物由来のコレステロールデヒドロゲナーゼなどがあげられるが、これら酵素の特異性、安定性をさらにあげるためにポリエチレングリコールを主成分とする基、水溶性のオリゴ糖残基、スルホプロビル基などで上記の酵素を化学的に修飾したものも用いられる。また、遺伝子操作により得られる酵素も用いられる。

【0012】本発明の系は、通常のコレステロールを測定する系を含んでいるため、コレステロールオキシダーゼを活性化するためによく使用される界面活性剤あるいはコール酸類も使用可能であり、また、グロブリンなどを可溶化するための種々の塩類を使用することもでき

る。界面活性剤としては、ノニオン系、アニオン系、カチオン系の界面活性剤が0～1%の範囲で使用され、コール酸類としては、コール酸、デオキシコール酸、タウロコール酸、ケノデオキシコール酸などが0～5%の範囲で使用され、塩類としては、塩化ナトリウム、硫酸ナトリウム、塩化カリウム、硫酸カリウム、塩化マグネシウム、硫酸マグネシウム、酢酸マグネシウム、塩化リチウム、硫酸リチウム、塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、硝酸マグネシウム、硝酸カルシウムなどが0～100mMの範囲で使用される。

【0013】緩衝剤としては、5～500mMのトリス、グッドの緩衝剤などが好適に使用される。pHは5*

本法の組成

第一試薬	リンタングステン酸	10	mg/ml (1.7mM)
	硫酸Mg・7水和物	7.5	
	EMSE	0.3	
	アジ化ナトリウム	0.1	
第二試薬	トリス	20	mM (pH7)
	4-アミノアンチピリン	0.5	mg/ml
	パーオキシダーゼ	30	u/ml
	コレステロールエステラーゼ	1	
	コレステロールオキシダーゼ	1	

本法では、検体50μlを第一試薬2.25mlに添加し、37℃で5分間インキュベーションし、この時点で一旦555nmの吸光度を測定した(E1)。次いで、第二試薬を0.75ml添加して攪拌し、5分後の同波長における吸光度を測定した(E2)。HDLコレステロールの濃度は、コレステロール濃度200mg/dlの標準液を用いて同様の操作を行い、(E2-E1)の※

第1表

	沈殿法	A法	本法
人血清 1	24mg/dl	58mg/dl	28mg/dl
人血清 2	38	79	39
人血清 3	56	82	57

【0018】本法は、現在HDLコレステロールの測定法として常用されているリンタングステン酸-デキストラン硫酸-Mg沈殿法とよい相関を示した。

実施例2

第一試薬に用いる凝集剤および2価の金属塩を種々組み換える以外は実施例1の本法と同様の操作を行い、血清★

第一試薬の組成

A.	リンタングステン酸	10	mg/ml (1.7mM)
	硫酸Mg・7水和物	7.5	
	EMSE	0.3	
B.	デキストラン硫酸		

*～9の範囲がよい。次に、実施例によって本発明の態様を説明する。

【0014】

【実施例】

実施例1

リンタングステン酸-デキストラン硫酸-Mg沈殿法【デタミナーHDL(協和メデックス社製)で沈殿】(臨床化学、初版、荻三男著、医典社、110頁、1987年)、直接HDLコレステロールを測定する本法および特開昭63-126498に記載のコール酸を用いる方法(以下、A法という)を比較した。

【0015】

※値を比較することにより算出した。

【0016】沈殿法では遠心分離後日立7250自動分析機を用いてデタミナーLTC(協和メデックス社製)で測定した。結果を第1表に示す。

【0017】

【表1】

40★検体30検体を日立7250自動分析機(検体4μl、第一試薬300μl、第二試薬100μlの条件)でそれぞれ測定した。沈殿法との相関を相関係数(R)でみた。

【0019】結果を第2表に示す。

7			8
	ナトリウム(MW=4000)	7.5	mg/ml (1.9 mM)
	硫酸Mg・7水和物	10	
	EMSE	0.3	
C.	ヘパリンナトリウム	10	mg/ml (0.7 mM)
	塩化Ca・2水和物	10	
	EMSE	0.3	
D.	リンタングステン酸	10	mg/ml (1.7 mM)
	デキストラン硫酸		
	ナトリウム(MW=200000)	7.5	(1.9 mM)
	硫酸Mg・7水和物	7.5	
	EMSE	0.3	
E.	リンタングステン酸	10	mg/ml (1.7 mM)
	ヘパリンナトリウム	7.5	(0.5 mM)
	硫酸Mg・7水和物	7.5	
	EMSE	0.3	
F.	リンタングステン酸	10	mg/ml (1.7 mM)
	PEG6000	7.5	(1.25 mM)
	硫酸Mg・7水和物	7.5	
	EMSE	0.3	
G.	PEG6000	5	mg/ml (0.83 mM)
	硫酸Mg・7水和物	5	
	EMSE	0.3	
H.	硫酸化		
	α-シクロデキストリン	1	mg/ml (0.8 mM)
	塩化Mg・6水和物	5	
	N-エチル-N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)- m-トリイジン	0.6	
I.	硫酸化		
	マルトヘプタオース	2	mg/ml (0.6 mM)
	塩化Mg・6水和物	5	
	N-エチル-N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-3, 5-ジメトキシアニリン	0.7	

[0020]
[表2]

第2表

相関係数	
A.	R=0.902
B.	R=0.859
C.	R=0.889
D.	R=0.923
E.	R=0.910
F.	R=0.909
G.	R=0.835
H.	R=0.911
I.	R=0.877

40

第一試薬に添加される2価の金属塩の種類を変え添加量を30 mMとして実施例1の本法と同様の操作を行い、血清検体30検体を日立7250自動分析機(検体4 μ l、第一試薬300 μ l、第二試薬100 μ lの条件)*

*でそれぞれ測定した。沈澱法との相関を相関係数(R)でみた。
【0022】結果を第3表に示す。

組成

第一試薬	リントングステン酸	10	mg/ml (1.7 mM)
	(2価金属塩	30	mM)
	EMSE	0.3	
	塩化ナトリウム	5	
	アジ化ナトリウム	0.1	
第二試薬	トリス	20	mM (pH7)
	4-アミノアンチピリン	0.5	mg/ml
	コール酸ナトリウム	5	
	パーオキシダーゼ	30	u/ml
	コレステロールエステラーゼ	1	
	コレステロールオキシダーゼ	1	

【0023】
【表3】

第3表

2価の金属塩	相関係数
硫酸Mg	R=0.914
塩化Ca	R=0.835
塩化Mn	R=0.816
塩化Ni	R=0.798

※【0024】実施例4

サンブライト4001(日本油脂)を用いコレステロールエステラーゼおよびコレステロールオキシダーゼをポリエチレングリコール(分子量6000)で化学修飾し、これを用いて下記に示す組成で実施例1の本法と同様の操作を行った。結果を第4表に示す。

【0025】なお、化学修飾は、以下のように行った。20 mMリン酸緩衝液(pH8)に酵素(10 mg/ml)を溶解させて5℃に冷却後、これに20倍モルのサンブライト4001を添加して溶解させ、5℃で4時間反応させた。得られた化学修飾酵素は、精製分離せずそのまま酵素溶液として用いた。

※【0026】

組成

第一試薬	リントングステン酸	10	mg/ml (1.7 mM)
	デキストラン硫酸		
	ナトリウム(MW=4000)	7.5	(1.9 mM)
	硫酸Mg・7水和物	7.5	
	EMSE	0.3	
	塩化ナトリウム	5	
	アジ化ナトリウム	0.1	
	アスコルビン酸		
	オキシダーゼ	1	u/ml
第二試薬	トリス	20	mM (pH7)
	4-アミノアンチピリン	0.5	mg/ml
	コール酸ナトリウム	5	
	パーオキシダーゼ	30	u/ml
	修飾コレステロール		
	エステラーゼ	1	
	修飾コレステロール		
	オキシダーゼ	1	

【0027】
【表4】

第 4 表

*【0028】実施例5

沈澱法			本法
人血清 1	2.4mg/dl		2.6mg/dl
人血清 2	3.8		3.7
人血清 3	5.6		5.6

*10

組成
試薬

ビベラジン-1, 4-ビス(2- エタンスルホニックアシッド) [同仁化学研究所(株)]	3	mg/ml (9.9mM) (pH7)
EMSE	0.3	
デキストラン硫酸 ナトリウム	0.7	mg/ml (1.4μM)
硫酸Mg・7水和物	7	
4-アミノアンチピリン	0.5	
パーオキシダーゼ	5	u/ml
コレステロールエステラーゼ	1	
コレステロールオキシダーゼ	5	

【0029】リンタングステン酸-デキストラン硫酸-Mg沈澱法でHDLコレステロール濃度が38.9mg/dlと測定された検体50μlを上記試薬3mlに添加し、20秒後に一旦555nmの吸光度を測定した(E1)。次いで、37℃で5分間インキュベーションし、直ちに同波長における吸光度を測定した(E2)。HDLコレステロールの濃度は、コレステロール濃度200mg/dlの標準液を用いて同様の操作を行い、(E2-E1)の値を比較することにより算出した。その結果、HDLコレステロール濃度は39.1mg/dlと算出され、沈澱法で得られた結果とほぼ一致した。

【0030】実施例6

(1) デキストランを修飾する試薬であるT40, TCT-activated (ベーリンガー社製)でコレステロールエステラーゼおよびコレステロールオキシダーゼを化学修飾したもの、(2) ポリウレタンを修飾する試薬であるポリウレタンP4000-activated (ベーリンガー社製)でコレステロールエステラーゼおよびコレステロールオキシダーゼを化学修飾したもの、および(3) 1, 3-プロパンサルTONでコレステロールエステラーゼおよびコレステロールオキシダーゼを化学修飾したものを、また、検体としてリンタングステン酸-デキストラン硫酸-Mg沈澱法でHDLコレステロール濃度が38.9mg/dlと測定された検

体50μlを用いて、実施例4と同様の操作を行った。その結果、HDLコレステロール濃度はそれぞれ(1) 39.7mg/dl、(2) 38.2mg/dlおよび(3) 39.0mg/dlと算出され、沈澱法で得られた結果とほぼ一致した。

【0031】なお、化学修飾は、以下のように行った。

(1), (2) 20mMリン酸緩衝液(pH8)に酵素(10mg/ml)を溶解させて5℃に冷却後、これに20倍モルのT40, TCT-activatedまたはポリウレタンP4000-activatedを添加して溶解させ、5℃で4時間反応させた。得られた化学修飾酵素は、精製分離せずそのまま酵素溶液として用いた。

【0032】(3) 20mMリン酸緩衝液(pH8)に酵素(10mg/ml)を溶解させ、これに20倍モルの1, 3-プロパンサルTONのジメチルホルムアミド溶液(10mg/ml)を添加し、37℃で24時間反応させた。得られた化学修飾酵素は、精製分離せずそのまま酵素溶液として用いた。

【0033】

【発明の効果】本発明により、煩雑な分画分離操作の不要な簡便なHDLコレステロールの定量法が提供される。

フロントページの続き

(72)発明者 上釜 兼人
熊本県熊本市長嶺町1716-80

(72)発明者 大澤 進
千葉県四街道市みそら4-17-9

(19)



JAPANESE PATENT OFFICE

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: **08131197 A**

(43) Date of publication of application: **28.05.96**

(51) Int. Cl

C12Q 1/60

C12Q 1/26

C12Q 1/32

C12Q 1/44

(21) Application number: **06296137**

(22) Date of filing: **30.11.94**

(30) Priority: **08.03.94 JP 06 37328**
12.09.94 JP 06217224

(71) Applicant: **KYOWA MEDEX CO LTD**

(72) Inventor: **MIYAUCHI KAZUTO**
MIKE AKIRA
SHUDO EIKO
SUGIUCHI HIROYUKI
IRIE TETSUYOSHI
KAMIKAMA KANEHITO
OSAWA SUSUMU

(54) **DETERMINATION OF CHOLESTEROL IN
HIGH-DENSITY LIPOPROTEIN**

(57) Abstract:

PURPOSE: To eliminate troublesome fractionating and separating operations and simply determine a high-density lipoprotein(HDL) cholesterol by initiating enzymic reaction for determining cholesterol with a cholesterol reactional reagent in the presence of a reagent for aggregating a lipoprotein other than the HDL.

CONSTITUTION: A cholesterol ester hydrolase and a cholesterol oxidase or a cholesterol dehydrogenase are reacted in the presence of a reagent for aggregating lipoproteins [a low-density lipoprotein(LDL), a

very-low-density lipoprotein(VLDL) and chylomicron] other than the HDL to determine produced hydrogen peroxide or a reduced form coenzyme. Thereby, an HDL cholesterol in a sample containing the HDL can specifically be determined without separating the produced aggregated substance.

COPYRIGHT: (C)1996,JPO

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平8-131197

(43) 公開日 平成8年(1996)5月28日

(51) Int.Cl. ⁹	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 Q	1/60	6807-4B		
	1/26	6807-4B		
	1/32	6807-4B		
	1/44	6807-4B		

審査請求 有 請求項の数 3 O L (全 8 頁)

(21) 出願番号 特願平6-296137

(22) 出願日 平成6年(1994)11月30日

(31) 優先権主張番号 特願平6-37328

(32) 優先日 平6(1994)3月8日

(33) 優先権主張国 日本 (J P)

(31) 優先権主張番号 特願平6-217224

(32) 優先日 平6(1994)9月12日

(33) 優先権主張国 日本 (J P)

(71) 出願人 000162478

協和メデックス株式会社

東京都中央区入船二丁目1番1号

(72) 発明者 宮内 一人

静岡県田方郡函南町仁田816-4

(72) 発明者 三池 彰

静岡県駿東郡長泉町納米里410-1

(72) 発明者 首藤 榮子

大分県大分市花園17組の3

(72) 発明者 杉内 博幸

熊本県熊本市長嶺町1675-31

(72) 発明者 入江 徹美

熊本県熊本市健軍町2484-17

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 高密度リポ蛋白中のコレステロールの定量法

(57) 【要約】

【目的】 煩雑な分画分離操作の不要な簡便な高密度リポ蛋白 (HDL) 中のコレステロールの定量法を提供する。

【構成】 HDL以外のリポ蛋白を凝集させる試薬の存在下、HDLを含有する試料にコレステロールエステル加水分解酵素およびコレステロール酸化酵素またはコレステロール脱水素酵素を作用させ、生成する過酸化水素または還元型補酵素を定量することを特徴とするHDL中のコレステロールの定量法。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 高密度リポ蛋白（HDL）以外のリポ蛋白を凝集させる試薬の存在下、HDLを含有する試料にコレステロールエステル加水分解酵素およびコレステロール酸化酵素またはコレステロール脱水素酵素を作用させ、生成する過酸化水素または還元型補酵素を定量することを特徴とするHDL中のコレステロールの定量法。

【請求項2】 HDL以外のリポ蛋白を凝集させる試薬がヘパリンまたはその塩、リントングステン酸またはその塩、デキストラン硫酸またはその塩、ポリエチレングリコール、硫酸化シクロデキストリンまたはその塩、硫酸化オリゴ糖またはその塩もしくはこれらの混合物、および2価の金属塩からなる請求項1記載のHDL中のコレステロールの定量法。

【請求項3】 コレステロールエステル加水分解酵素、コレステロール酸化酵素またはコレステロール脱水素酵素が化学修飾されたコレステロールエステラーゼ、化学修飾されたコレステロールオキシダーゼまたは化学修飾されたコレステロールデヒドロゲナーゼである請求項1記載のHDL中のコレステロールの定量法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、臨床診断の分野において脂質代謝の面で重要な高密度リポ蛋白（HDL）中のコレステロール（以下、HDLコレステロールという）の定量法に関する。

【0002】

【従来の技術】 HDLは、動脈壁を含めた各組織からコレステロールを受け取るため細胞内に蓄積したコレステロールの除去作用に関係し、冠動脈硬化症をはじめとする各種動脈硬化症の危険予防因子であり、その血中レベルは動脈硬化性疾患の発症予知に有用な指針となることが知られている。従来のHDLコレステロールの定量法は、大きく分けて分画操作とコレステロール定量操作の2段階からなる。分画操作法には、超遠心法、免疫化学的方法、電気泳動法、沈殿法などがある。超遠心法を用いる場合には、分離用超遠心器で比重の差によってHDLを分離し、そのコレステロール量を測定する。しかしながら、定量性、簡便性、経済性などの面で欠点がある。免疫化学的方法には、免疫電気泳動法、一元免疫拡散法（SRID法）、オクタロニー法などがあるが、これらの方法を用いる場合にはアポ蛋白を認識しており、正確にはリポ蛋白を認識していないという問題がある。電気泳動法を用いる場合には、セルロースアセテート膜やアガロースゲルなどを支持体として分離し、酵素法によりコレステロールを定量する。この方法は、簡便性、経済性などの面で問題がある。沈殿法を用いる場合には、低密度リポ蛋白（LDL）、超低密度リポ蛋白（VLDL）およびカイロミクロン（CM）の表面に存在するアポ蛋白Bにポリエチレングリコール、ヘパリン、リ

ンタングステン酸、デキストラン硫酸などのポリアニオンと2価の陽イオンを結合させ、不溶性沈殿物を形成させ、これを遠心分離操作によって除去し、上清中のHDLコレステロールを定量する（臨床検査法提要、第29版、金井泉著、金原出版、471頁、1983年）。この方法は最も簡便であるが、遠心分離器による遠心分離操作を行うため、多数検体処理、迅速測定および臨床検査の分野で多く使用されている自動分析装置には不向きである。さらに、従来の分画法では、分離したHDL画分を定量ビペットではかり取る場合などに人為的誤差も生じ易い。以上のように、HDLコレステロール測定は煩雑さは、その分画操作にある。しかしながら、単純にHDLを分画せずに血清検体を直接コレステロールエステラーゼとコレステロールオキシダーゼが含有された試薬に添加しても、総コレステロールを定量する系と変わりがなく、HDLコレステロールを特異的に定量できない。特開昭63-126498には、コール酸類を添加してその特異性を高めることが記載されているが、この方法では、HDLのみならずLDL、VLDLなども徐々に反応し完全な反応終点が得られにくいことにより、特異性が必ずしも充分でない。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】 本発明の目的は、煩雑な分画分離操作の不要な簡便なHDLコレステロールの定量法を提供することにある。

【0004】

【課題を解決するための手段】 本発明者らは、HDL以外のリポ蛋白すなわちLDL、VLDLおよびCMを凝集させる試薬の存在下、コレステロール反応試薬を用いてコレステロール定量の酵素反応をさせることにより、特に生成した凝集物を分離することなくHDLを含有する試料中のHDLコレステロールを特異的に定量できることを見出し、本発明に至った。

【0005】 本発明は、HDL以外のリポ蛋白を凝集させる試薬の存在下、HDLを含有する試料にコレステロール加水分解酵素およびコレステロール酸化酵素またはコレステロール脱水素酵素を作用させ、生成する過酸化水素または還元型補酵素を定量することを特徴とするHDL中のコレステロールの定量法に関する。

【0006】 本発明方法は、血液、尿などのHDLを含有する体液に適用できる。次に、本発明の定量法の一例について説明する。第一試薬として、HDL以外のリポ蛋白を凝集させる試薬を含む中性付近の緩衝液を調製する。また、第二試薬として、コレステロールエステラーゼ、コレステロールオキシダーゼ（またはコレステロールデヒドロゲナーゼ）、パーオキシダーゼ、4-アミノアンチピリンおよびトリンダー試薬〔またはNAD

（P）〕を含む緩衝液を調製する（トリンダー試薬は第一試薬中に入れてもよい）。体液検体を一定量第一試薬に添加し、例えば37℃で数分間加温してLDL、VL

DLおよびCMを凝集させる。これに第二試薬を添加、攪拌して酵素反応させた後、コレステロールオキシダーゼにより過酸化水素が発生する場合には4-アミノアンチピリンおよびトリンダー試薬から過酸化水素とパーオキシダーゼによって生成する色素の極大波長における吸光度を測定し、コレステロールデヒドロゲナーゼを用いる場合にはNAD(P)Hの増加を300~500nm、好ましくは330~400nm、例えば340nmでの吸光度で測定する(ジアホラーゼ、テトラゾリウム塩を添加してホルマゼン色素の発色に導き、ホルマゼン色素を比色定量することも可能である)。HDLコレステロール量は、別途一定量のコレステロールを含む標準液で同じ操作を行い、比較計算する。なお、第一試薬と第二試薬とを最初からまとめ、これに体液検体を添加して例えば37℃で数分間加温し、LDL、VLDLおよびCMを凝集させてさらに酵素反応させることもできる。

【0007】リポ蛋白を凝集させる試薬には凝集剤および2価の金属塩が含まれる。凝集剤としては、ヘパリンまたはその塩、リンタングステン酸またはその塩、デキストラン硫酸またはその塩、ポリエチレングリコール、硫酸化シクロデキストリンまたはその塩、硫酸化オリゴ糖またはその塩、もしくはこれらの混合物などがあげられ、シクロデキストリンとしては、 α -シクロデキストリン、 β -シクロデキストリン、 γ -シクロデキストリンなどがあげられ、オリゴ糖としては、マルトトリオース、マルトテトラオース、マルトペンタオース、マルトヘキサオース、マルトヘプタオースなどがあげられ、塩としては、ナトリウム塩、カリウム塩、リチウム塩、アンモニウム塩、マグネシウム塩などがあげられる。2価の金属塩としては、マグネシウム塩、カルシウム塩、マンガン塩、ニッケル塩などがあげられる。

【0008】凝集剤としては、0.02~10mMの分子量5000~20000のヘパリンまたはその塩、0.1~10mMの分子量4000~8000のリンタングステン酸またはその塩、0.01~5mMの分子量10000~500000のデキストラン硫酸またはその塩、0.1~20mMの分子量1000~10000のデキストラン硫酸またはその塩、0.3~100mMの分子量4000~25000のポリエチレングリコール(PEG)、0.1~50mMの分子量1000~3000の硫酸化シクロデキストリンまたはその塩、0.1~50mMの分子量400~3000の硫酸化オリゴ糖またはその塩、もしくはこれらの混合物などが好ましく用いられる。さらに好ましくは、0.03~1mMの分子量14000~16000のヘパリンまたはその塩、0.1~3mMの分子量5000~7000のリンタングステン酸またはその塩、0.01~5mMの分子量150000~250000のデキストラン硫酸またはその塩、0.1~10mMの分子量1000~500

0のデキストラン硫酸またはその塩、1.0~50mMの分子量5000~22000のPEG、0.1~10mMの分子量1000~2000の硫酸化シクロデキストリンまたはその塩、0.1~10mMの分子量400~2000の硫酸化オリゴ糖またはその塩、もしくはこれらの混合物などが用いられる。

【0009】2価の金属塩としては、0.1~50mMのマグネシウム塩、カルシウム塩、マンガン塩、ニッケル塩などがあげられ、好ましくは、0.1~50mMのマグネシウム塩が用いられる。

【0010】トリンダー試薬としては、N-エチル-N-(3-メチルフェニル)-N'-サクシニルエチレンジアミン(EMSE)、N-エチル-N-(3-メチルフェニル)-N'-アセチルエチレンジアミン、N,N-ジメチル-m-トルイジン、N,N-ジスルホプロピル-3,5-ジメトキシアニリン、N-エチル-N-スルホプロピル-m-アニシジン、N-エチル-N-スルホプロピルアニリン、N-エチル-N-スルホプロピル-3,5-ジメトキシアニリン、N-スルホプロピル-3,5-ジメトキシアニリン、N-エチル-N-スルホプロピル-3,5-ジメチルアニリン、N-エチル-N-スルホプロピル-m-トルイジン、N-エチル-N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-m-アニシジン、N-エチル-N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)アニリン、N-エチル-N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-3,5-ジメトキシアニリン、N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-3,5-ジメトキシアニリン、N-エチル-N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-3,5-ジメチルアニリン、N-エチル-N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-m-トルイジン、N-スルホプロピルアニリン、3-ヒドロキシ-2,4,6-トリヨード安息香酸、フェノールなどがあげられる。

【0011】酵素としては、通常市販されている、コレステロールエステルを加水分解する能力を有する微生物または動物由来のコレステロールエステラーゼやリポプロテインリパーゼ、コレステロールを酸化して過酸化水素を生成する微生物由来のコレステロールオキシダーゼ、微生物または動物由来のコレステロールデヒドロゲナーゼなどがあげられるが、これら酵素の特異性、安定性をさらにあげるためにポリエチレングリコールを主成分とする基、水溶性のオリゴ糖残基、スルホプロピル基などで上記の酵素を化学的に修飾したものも用いられる。また、遺伝子操作により得られる酵素も用いられる。

【0012】本発明の系は、通常のコレステロールを測定する系を含んでいるため、コレステロールオキシダーゼを活性化するためによく使用される界面活性剤あるいはコール酸類も使用可能であり、また、グロブリンなどを可溶化するための種々の塩類を使用することもでき

る。界面活性剤としては、ノニオン系、アニオン系、カチオン系の界面活性剤が0~1%の範囲で使用され、コール酸類としては、コール酸、デオキシコール酸、タウロコール酸、ケノデオキシコール酸などが0~5%の範囲で使用され、塩類としては、塩化ナトリウム、硫酸ナトリウム、塩化カリウム、硫酸カリウム、塩化マグネシウム、硫酸マグネシウム、酢酸マグネシウム、塩化リチウム、硫酸リチウム、塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、硝酸マグネシウム、硝酸カルシウムなどが0~100mMの範囲で使用される。

【0013】緩衝剤としては、5~500mMのトリス、グッドの緩衝剤などが好適に使用される。pHは5 *

本法の組成

第一試薬	リントングステン酸	10	mg/ml (1.7mM)
	硫酸Mg・7水和物	7.5	
	EMSE	0.3	
	アジ化ナトリウム	0.1	
第二試薬	トリス	20	mM (pH7)
	4-アミノアンチピリン	0.5	mg/ml
	パーオキシダーゼ	30	u/ml
	コレステロールエステラーゼ	1	
	コレステロールオキシダーゼ	1	

本法では、検体50μlを第一試薬2.25mlに添加し、37℃で5分間インキュベーションし、この時点で一旦555nmの吸光度を測定した(E1)。次いで、第二試薬を0.75ml添加して攪拌し、5分後の同波長における吸光度を測定した(E2)。HDLコレステロールの濃度は、コレステロール濃度200mg/dlの標準液を用いて同様の操作を行い、(E2-E1)の※

*~9の範囲がよい。次に、実施例によって本発明の態様を説明する。

【0014】

【実施例】

実施例1

リントングステン酸-デキストラン硫酸-Mg沈殿法
〔デタミナーHDL (協和メデックス社製) で沈殿〕
〔臨床化学、初版、荻三男著、医典社、110頁、1987年〕、直接HDLコレステロールを測定する本法および特開昭63-126498に記載のコール酸を用いる方法 (以下、A法という) を比較した。

【0015】

※値を比較することにより算出した。

【0016】沈殿法では遠心分離後日立7250自動分析機を用いてデタミナーLTC (協和メデックス社製) で測定した。結果を第1表に示す。

【0017】

【表1】

第1表

	沈殿法	A法	本法
人血清 1	24mg/dl	58mg/dl	28mg/dl
人血清 2	38	79	39
人血清 3	56	82	57

【0018】本法は、現在HDLコレステロールの測定法として常用されているリントングステン酸-デキストラン硫酸-Mg沈殿法とよい相関を示した。

実施例2

第一試薬に用いる凝集剤および2価の金属塩を種々組み換える以外は実施例1の本法と同様の操作を行い、血清 ★

第一試薬の組成

A.	リントングステン酸	10	mg/ml (1.7mM)
	硫酸Mg・7水和物	7.5	
	EMSE	0.3	
B.	デキストラン硫酸	50	

★検体30検体を日立7250自動分析機 (検体4μl、第一試薬300μl、第二試薬100μlの条件) でそれぞれ測定した。沈殿法との相関を相関係数(R)でみた。

【0019】結果を第2表に示す。

	ナトリウム(MW=4000)	7.5	mg/ml (1.9mM)
	硫酸Mg・7水和物	10	
	EMSE	0.3	
C.	ヘパリンナトリウム	10	mg/ml (0.7mM)
	塩化Ca・2水和物	10	
	EMSE	0.3	
D.	リントングステン酸	10	mg/ml (1.7mM)
	デキストラン硫酸		
	ナトリウム(MW=200000)	7.5	(1.9mM)
	硫酸Mg・7水和物	7.5	
	EMSE	0.3	
E.	リントングステン酸	10	mg/ml (1.7mM)
	ヘパリンナトリウム	7.5	(0.5mM)
	硫酸Mg・7水和物	7.5	
	EMSE	0.3	
F.	リントングステン酸	10	mg/ml (1.7mM)
	PEG6000	7.5	(1.25mM)
	硫酸Mg・7水和物	7.5	
	EMSE	0.3	
G.	PEG6000	5	mg/ml (0.83mM)
	硫酸Mg・7水和物	5	
	EMSE	0.3	
H.	硫酸化		
	α-シクロデキストリン	1	mg/ml (0.8mM)
	塩化Mg・6水和物	5	
	N-エチル-N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-		
	m-トルイジン	0.6	
I.	硫酸化		
	マルトヘプタオース	2	mg/ml (0.6mM)
	塩化Mg・6水和物	5	
	N-エチル-N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-3,		
	5-ジメトキシアニリン	0.7	

【0020】

【表2】

*

第2表

相関係数	
A.	R=0.902
B.	R=0.859
C.	R=0.889
D.	R=0.923
E.	R=0.910
F.	R=0.909
G.	R=0.835
H.	R=0.911
I.	R=0.877

*【0021】実施例3

第一試薬に添加される2価の金属塩の種類を変え添加量を30mMとして実施例1の本法と同様の操作を行い、血清検体30検体を日立7250自動分析機(検体4μl、第一試薬300μl、第二試薬100μlの条件) *

*でそれぞれ測定した。沈澱法との相関を相関係数(R)でみた。

【0022】結果を第3表に示す。

組成

第一試薬	リンタングステン酸	10	mg/ml (1.7mM)
	(2価金属塩	30	mM)
	EMSE	0.3	
	塩化ナトリウム	5	
	アジ化ナトリウム	0.1	
第二試薬	トリス	20	mM (pH7)
	4-アミノアンチピリン	0.5	mg/ml
	コール酸ナトリウム	5	
	パーオキシダーゼ	30	u/ml
	コレステロールエステラーゼ	1	
	コレステロールオキシダーゼ	1	

【0023】

【表3】

第3表

2価の金属塩	相関係数
硫酸Mg	R=0.914
塩化Ca	R=0.835
塩化Mn	R=0.816
塩化Ni	R=0.798

※【0024】実施例4

※ サンプライト4001(日本油脂)を用いコレステロールエステラーゼおよびコレステロールオキシダーゼをポリエチレングリコール(分子量6000)で化学修飾し、これを用いて下記に示す組成で実施例1の本法と同様の操作を行った。結果を第4表に示す。

【0025】なお、化学修飾は、以下のように行った。20mMリン酸緩衝液(pH8)に酵素(10mg/ml)を溶解させて5℃に冷却後、これに20倍モルのサンプライト4001を添加して溶解させ、5℃で4時間反応させた。得られた化学修飾酵素は、精製分離せずそのまま酵素溶液として用いた。

【0026】

組成

第一試薬	リンタングステン酸	10	mg/ml (1.7mM)
	デキストラン硫酸		
	ナトリウム(MW=4000)	7.5	(1.9mM)
	硫酸Mg・7水和物	7.5	
	EMSE	0.3	
	塩化ナトリウム	5	
	アジ化ナトリウム	0.1	
	アスコルビン酸		
	オキシダーゼ	1	u/ml
第二試薬	トリス	20	mM (pH7)
	4-アミノアンチピリン	0.5	mg/ml
	コール酸ナトリウム	5	
	パーオキシダーゼ	30	u/ml
	修飾コレステロール		
	エステラーゼ	1	
	修飾コレステロール		
	オキシダーゼ	1	

【0027】

【表4】

第 4 表

【0028】実施例5

	沈殿法	本法
人血清 1	24mg/dl	26mg/dl
人血清 2	38	37
人血清 3	56	56

組成

試薬

ピペラジン-1, 4-ビス (2- エタンスルホニックアシッド) [同仁化学研究所 (株)]	3 mg/ml (9.9mM) (pH7)
EMSE	0.3
デキストラン硫酸 ナトリウム	0.7 mg/ml (1.4μM)
硫酸Mg・7水和物	7
4-アミノアンチピリン	0.5
パーオキシダーゼ	5 u/ml
コレステロールエステラーゼ	1
コレステロールオキシダーゼ	5

【0029】リンタングステン酸-デキストラン硫酸-Mg沈殿法でHDLコレステロール濃度が38.9mg/dlと測定された検体50μlを上記試薬3mlに添加し、20秒後に一旦555nmの吸光度を測定した (E1)。次いで、37℃で5分間インキュベーションし、直ちに同波長における吸光度を測定した (E2)。HDLコレステロールの濃度は、コレステロール濃度200mg/dlの標準液を用いて同様の操作を行い、(E2-E1)の値を比較することにより算出した。その結果、HDLコレステロール濃度は39.1mg/dlと算出され、沈殿法で得られた結果とほぼ一致した。

【0030】実施例6

(1) デキストランを修飾する試薬であるT40, TCT-activated (ベーリンガー社製) でコレステロールエステラーゼおよびコレステロールオキシダーゼを化学修飾したもの、(2) ポリウレタンを修飾する試薬であるポリウレタンP4000-activated (ベーリンガー社製) でコレステロールエステラーゼおよびコレステロールオキシダーゼを化学修飾したもの、および(3) 1, 3-プロパンサルTONでコレステロールエステラーゼおよびコレステロールオキシダーゼを化学修飾したものを、また、検体としてリンタングステン酸-デキストラン硫酸-Mg沈殿法でHDLコレステロール濃度が38.9mg/dlと測定された検

* 体50μlを用いて、実施例4と同様の操作を行った。その結果、HDLコレステロール濃度はそれぞれ(1) 39.7mg/dl、(2) 38.2mg/dlおよび(3) 39.0mg/dlと算出され、沈殿法で得られた結果とほぼ一致した。

【0031】なお、化学修飾は、以下のようにして行った。

(1), (2) 20mMリン酸緩衝液 (pH8) に酵素 (10mg/ml) を溶解させて5℃に冷却後、これに20倍モルのT40, TCT-activatedまたはポリウレタンP4000-activatedを添加して溶解させ、5℃で4時間反応させた。得られた化学修飾酵素は、精製分離せずそのまま酵素溶液として用いた。

【0032】(3) 20mMリン酸緩衝液 (pH8) に酵素 (10mg/ml) を溶解させ、これに20倍モルの1, 3-プロパンサルTONのジメチルホルムアミド溶液 (10mg/ml) を添加し、37℃で24時間反応させた。得られた化学修飾酵素は、精製分離せずそのまま酵素溶液として用いた。

【0033】

【発明の効果】本発明により、煩雑な分画分離操作の不要な簡便なHDLコレステロールの定量法が提供される。

フロントページの続き

(72)発明者 上釜 兼人

熊本県熊本市長嶺町1716-80

(72)発明者 大澤 進

千葉県四街道市みそら4-17-9